



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 : C12Q 1/68		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 91/02087 (43) Date de publication internationale: 21 février 1991 (21.02.91)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR90/00585</p> <p>(22) Date de dépôt international: 2 août 1990 (02.08.90)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 89/10802 11 août 1989 (11.08.89) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): BERTIN & CIE [FR/FR]; BP N° 3, F-78373 Plaisir Cédex (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): COHEN, Daniel [FR/FR]; 5, rue Jeanne-d'Arc, F-94160 S.-Mandé (FR). DUFAU, Frédéric [FR/FR]; 9, hameau de Bois-Fontaine, F-78170 La Celle-S.-Cloud (FR). HACHE, Jean [FR/FR]; 3, allée de l'Epée, F-78960 Voisins-le-Bretonneux (FR). JEANPIERRE, Marc [FR/FR]; 94, rue Le-curbe, F-75015 Paris (FR). GINOT, Frédéric [FR/FR]; 92, rue de la Procession, F-75015 Paris (FR). MARTINEZ, Marie-Christine [FR/FR]; 2, rue du Colonel-Candlot, F-92340 Bourg-la-Reine (FR). ROUSSEL, Brigitte [FR/FR]; 63, voie des Sculpteurs, Résidence Les Platanes, F-92800 Puteaux (FR). TROTTON, Agnès [FR/FR]; 12, place Bonsergent, F-75010 Paris (FR).</p>		<p>(74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, KR, NO, US.</p> <p>Publiée</p> <p><i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>	
<p>(54) Title: FAST PROCESS FOR DETECTING AND/OR IDENTIFYING A SINGLE BASE ON A NUCLEIC ACID SEQUENCE AND ITS APPLICATIONS</p> <p>(54) Titre: PROCEDE RAPIDE DE DETECTION ET/OU D'IDENTIFICATION D'UNE SEULE BASE SUR UNE SEQUENCE D'ACIDE NUCLEIQUE, ET SES APPLICATIONS</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The feature of this process is that: (1) the sequence on which the base to be identified is located is made hybrid with a nucleotide of adequate length; (2) the synthesis of the complementary strand of the hybrid obtained in (1) is started, said nucleotide acting as a trigger, in the presence of: a polymerase without 3'5' exonuclease action; and at least one modified nucleotide base; (3) the incorporated blocking nucleotide base is detected by any suitable means. Application: diagnosis of genetic diseases.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>Procédé de détection et/ou d'identification d'une seule base sur une séquence d'acide nucléique. Ce procédé est caractérisé en ce que: (1) on hybridise la séquence sur laquelle se trouve la base à identifier avec un nucléotide de longueur suffisante; (2) on débute la synthèse du brin complémentaire de l'hybride obtenu en (1), -ledit nucléotide servant d'amorce- en présence: d'une polymérase sans action exonucléase 3'5' et d'au moins une base nucléotidique modifiée; (3) on détecte la base nucléotidique bloquante incorporée par tout moyen approprié. Application: diagnostic des maladies génétiques.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures
publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT Autriche
AU Australie
BB Barbade
BE Belgique
BF Burkina Fasso
BG Bulgarie
BJ Bénin
BR Brésil
CA Canada
CF République Centrafricaine
CG Congo
CH Suisse
CM Cameroun
DE Allemagne, République fédérative d'
DK Danemark

BS Espagne
FI Finlande
FR France
GA Gabon
GB Royaume-Uni
GR Grèce
HU Hongrie
IT Italie
JP Japon
KP République populaire démocratique
de Corée
KR République de Corée
LI Liechtenstein
LK Sri Lanka
LU Luxembourg

MC Monaco
MG Madagascar
ML Mali
MR Mauritanie
MW Malawi
NL Pays-Bas
NO Norvège
RO Roumanie
SD Soudan
SE Suède
SN Sénégal
SU Union soviétique
TD Tchad
TG Togo
US Etats-Unis d'Amérique

1

PROCEDE RAPIDE DE DETECTION ET/OU D'IDENTIFICATION D'UNE SEULE BASE SUR UNE SEQUENCE D'ACIDE NUCLEIQUE, ET SES APPLICATIONS.

La présente invention est relative à un procédé de détection et/ou d'identification d'une seule base sur une séquence d'acide nucléique, ainsi qu'à ses applications, notamment dans le diagnostic des maladies génétiques et dans le contrôle d'une hybridation.

L'hybridation d'acide nucléique a été utilisée pour étudier l'identité et établir la présence d'acides nucléiques. L'hybridation est basée sur l'appariement de bases complémentaires. Lorsque des acides nucléiques simple brin complémentaires sont incubés ensemble, lesdits acides nucléiques simple brin s'apparent pour former une molécule hybride double brin. La capacité de l'ADN simple brin ou de l'ARN à former une structure avec une séquence d'acide nucléique complémentaire est utilisée comme méthode d'analyse et de diagnostic. La disponibilité de nucléosides triphosphates radioactifs ayant une activité spécifique importante et le marquage de l'ADN au ^{32}P en présence d'enzymes à fonction polymérase, par exemple la T₄ kinase, a permis d'identifier, d'isoler et de caractériser de nombreuses séquences d'acides nucléiques d'intérêt biologique.

L'hybridation représente un critère important dans la détection de la présence de séquence d'acide nucléique particulières comme par exemple :

- dans les maladies génétiques humaines ou animales où une modification héréditaire du patrimoine génétique a des conséquences morbides (par insertion, délétion ou mutation ponctuelle d'une séquence particulière) ;

- dans les maladies cancéreuses, où des réarrangements de l'ADN génomique sont observés ;

- au cours des infections où l'on décèle la présence de génomes étrangers tels que celui des

microorganismes (bactéries, champignons et virus par exemple) ;

- pour l'identification des individus en général :

5 en médecine légale (paternité, filiation par exemple),

dans le domaine agroalimentaire (plantes, contrôle sanitaire par exemple).

Cependant, l'hybridation comme outil de diagnostic peut être limitée par la difficulté de sa mise en œuvre (techniques lourdes) ou par l'absence de spécificité de l'hybridation (protocole opératoire).

En effet, l'étude chimique de l'hybridation a mis en évidence l'influence de la concentration de chacun des brins d'acides nucléiques impliqués, de leurs longueurs, de leurs compositions en bases, de la température, du pH, de la force ionique, de la viscosité du milieu.

La température notamment, est critique et doit rester inférieure à la température de fusion (T_m : température à laquelle 50 % des séquences sont sous forme double brin). En solution, la température optimale d'hybridation est 25°C en dessous de la T_m pour une sonde de 150 nucléotides et légèrement plus basse pour les sondes plus courtes.

Ainsi lorsque l'on veut détecter un mutation portant sur une seule base, on peut généralement utiliser, selon les cas, deux types de sondes : des sondes d'acide nucléique dites longues, supérieures à 150 nucléotides en général, ou des sondes d'acide nucléique dites courtes entre 17 et 24 nucléotides en général. Si la mutation intervient dans un site reconnu spécifiquement par une enzyme dite de restriction, on peut utiliser la technique de Southern : celle-ci comporte les étapes d'isolement de l'ADN, de digestion par l'enzyme de restriction, d'électrophorèse sur gel, de transfert sur une

membrane et d'hybridation à l'aide d'une sonde longue intéressante la région de la mutation ; après lavage et autoradiographie, l'analyse des tailles des fragments obtenus permet d'infirmer ou confirmer la présence de la mutation. Le procédé très lourd nécessite que la mutation intéresse un site de restriction. Si ce n'est pas le cas, on peut synthétiser une sonde courte oligonucléotidique de 17 à 24 nucléotides dont le centre coïncide avec la mutation que l'on veut détecter. En choisissant des conditions appropriées d'hybridation et de rinçage (spécifique de chaque système), on ne peut obtenir une hybridation à l'aide de l'oligonucléotide marquée qu'en cas d'homologie parfaite (une seule différence nucléotidique, notamment à l'endroit de la mutation, entraîne la déstabilisation de l'hybridation).

Cependant, ces différentes méthodes présentent un certain nombre d'inconvénients:

- conditions de température difficiles à maîtriser, pour obtenir une hybridation appropriée ;
- 20 - éventuellement présence obligatoire d'un site de restriction ;
- immobilisation de l'acide nucléique sur membrane (Southern blot).

Le Brevet Américain AMERSHAM n° 4 656 127, a permis de pallier certains de ces inconvénients, notamment en ce qu'il permet de détecter une mutation présente à un endroit ne présentant pas de site de clivage par une enzyme de restriction.

Ce Brevet Américain n° 4 656 127, décrit une méthode de détection de la mutation d'une base nucléotidique spécifique dans un fragment d'acide nucléique (ADN ou ARN) cible par :
(a) hybridation d'une sonde avec la séquence cible pour former un hybride d'acide nucléique, dans lequel une extrémité de la sonde est hybridée de manière adjacente à la base nucléotidique spécifique ;

- (b) mélange de l'hybride avec un dérivé nucléotidique dans des conditions appropriées à l'elongation de la sonde, de manière à permettre la jonction dérivé nucléotidique - extrémité de la sonde, seulement si la base 5 spécifique dans la séquence cible est (ou n'est pas) la mutation à détecter, une sonde associée audit dérivé nucléotidique étant résistante à une digestion dans des conditions particulières ;
- (c) digestion de l'hybride par une exonucléase dans des 10 conditions telles que le fragment double brin est progressivement digéré à partir de l'extrémité de la sonde à moins que ladite extrémité ait été mise en jonction avec ledit dérivé nucléotidique ;
- (d) élimination des portions de la sonde qui ne sont plus 15 hybridées à la chaîne d'acide nucléique ;
- (e) et détection d'une mutation de la base nucléotidique spécifique dans la séquence cible par détection de la présence ou de l'absence de la sonde après digestion.

20 Ce procédé implique en particulier en plus de la sonde, l'utilisation d'un dérivé nucléotidique ayant des propriétés particulières et comporte de ce fait encore de nombreuses étapes. De plus, il nécessite, pour sa réalisation, une immobilisation de l'acide nucléique sur une membrane et également un marquage (de la sonde ou 25 du dérivé nucléotidique).

La présente invention s'est en conséquence, donné pour but de pourvoir à un procédé d'identification d'une base nucléotidique spécifique, aisément et rapidement à mettre en œuvre, qui répond mieux aux nécessités de la 30 pratique que les procédés de l'Art antérieur, notamment en ce que le procédé conforme à l'invention ne nécessite pas un protocole opératoire complexe, c'est-à-dire ne nécessite ni immobilisation de l'ADN, ni marquage de la sonde, et s'applique à la détection de séquences d'acide 35 nucléique particulières, notamment dans les maladies génétiques, les maladies cancéreuses, les infections,

l'identification d'individus humains, animaux ou végétaux.

La présente invention a pour objet un procédé de détection et/ou d'identification d'une base nucléotidique spécifique présente sur une séquence d'acide nucléique, caractérisé en ce que :

- (1) on hybride la séquence sur laquelle se trouve la base à identifier avec un nucléotide de longueur suffisante pour permettre une hybridation correcte, quelle que soit 10 la température de réaction, ledit nucléotide s'hybridant avec la séquence cible, de manière à ce que son extrémité 3' soit adjacente à la base nucléotidique spécifique à détecter et/ou à identifier ;
- (2) on débute la synthèse du brin complémentaire de 15 l'hybride obtenu en (1), - ledit nucléotide servant d'amorce -, en présence :
 - d'une polymérase sans action exonucléase 3'5' et
 - d'au moins une base nucléotidique modifiée, de manière à être incorporable dans le produit d'extension de 20 l'amorce, ladite incorporation bloquant l'elongation dudit produit d'extension ;
- (3) on détecte la base nucléotidique bloquante incorporée par tout moyen approprié, ladite détection permettant d'identifier la base nucléotidique spécifique complémentaire présente sur la séquence cible à analyser.

On entend par nucléotide, au sens de la présente invention, aussi bien un oligonucléotide, qui comprend de 10 à 50 bases qu'un nucléotide pouvant comprendre plus de cent bases.

30 Selon un mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, les bases nucléotidiques bloquantes sont des didésoxynucléotides.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, lesdites bases nucléotidiques bloquantes sont marquées de manière appropriée notamment par 35 un marqueur choisi dans le groupe qui comprend des sub-

stances radioactives, des enzymes, des produits chimiques chromophores fluorescents ou chimioluminescents et des anticorps appropriés.

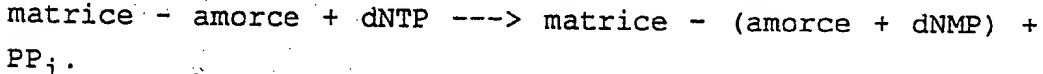
Selon une disposition avantageuse de ce mode
5 de mise en œuvre, le marqueur est identique ou différent pour chacune des bases nucléotidiques bloquantes.

Selon une modalité de cette disposition, lorsque les quatre bases bloquantes sont marquées à l'aide de marqueurs différents, la détection des quatre
10 nucléotides bloquants est avantageusement simultanée.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, lorsque les quatre bases bloquantes sont marquées de manière identique ou bien lorsqu'elles ne sont pas marquées, la détection des quatre nucléotides
15 bloquants est réalisée successivement et/ou séparément.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, on détecte, de manière appropriée, le pyrophosphate formé lors de la réaction de polymérisation.

20 En effet, la réaction de polymérisation génère la production d'un pyrophosphate, comme suit :



En mesurant le pyrophosphate dans chaque tube
25 de réaction, il est possible de déterminer pour laquelle des bases une réaction de polymérisation s'est produite.

Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, on détecte chaque base nucléotidique marquée.

30 En effet, chaque tube de réaction contient, en ce cas, une seule base nucléotidique marquée, les trois autres ne l'étant pas ; la mesure de la base marquée (par fluorescence, radioactivité...) permet de déterminer pour laquelle des bases une réaction de polymérisation s'est produite, les bases marquées non incorporées étant éliminées par lavage.

Le procédé conforme à l'invention a notamment l'avantage de permettre de définir les conditions opératoires, indépendamment de la base nucléotidique à identifier et de ne pas nécessiter d'immobilisation de l'acide nucléique sur une membrane.

La présente invention a également pour objet un kit ou coffret de diagnostic, prêt à l'emploi, pour la mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend outre les quantités convenables de réactifs et tampons adaptés à la mise en oeuvre du procédé :

- des quantités appropriées d'un nucléotide (servant d'amorce) capable de s'hybrider avec la séquence cible de manière à ce que son extrémité 3' soit adjacente à la base nucléotidique spécifique à détecter ;
- des quantités appropriées de quatre bases nucléotidiques modifiées de manière à être incorporables dans le produit d'extension de l'amorce tout en bloquant l'élongation dudit produit d'extension ; et
- des quantités appropriées d'une polymérase sans action exonucléase 3'5'.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit kit ou coffret, les bases nucléotidiques modifiées sont des didésoxynucléotides (ddTTP, ddGTP, ddATP, ddCTP).

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit kit ou coffret, les bases nucléotidiques modifiées sont marquées de manière appropriée notamment par un marqueur choisi dans le groupe qui comprend des substances radioactives, des enzymes, des produits chimiques chromophores fluorescents ou chimioluminescents et des anticorps appropriés.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux dudit kit ou coffret, il comprend, en outre, des réactifs appropriés pour le dosage du pyrophosphate.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre.

L'invention sera mieux comprise à l'aide du 5 complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de 10 l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Exemple 1 : diagnostic de la drépanocytose par le procédé conforme à l'invention (mesure des didésoxynucléotides fluorescents).

15 La drépanocytose ou anémie falciforme est due à une mutation dans l'un des exons du gène β codant pour la chaîne β de l'hémoglobine (Hb). Cette mutation consistant en une substitution d'une adénine (A) par une thymine (T), modifie le codon GAG, traduit en un acide glutamique (en position G) dans l'Hb normale, en codon GTG, traduit en une valine dans l'Hb anormale (HbS).

L'ADN qui a été utilisé dans cet exemple correspond à une séquence d'ADN amplifié simple-brin.

a) Blocage des amorces d'amplification.

25 * mélanger dans un tube de microcentrifugation, pour chaque ADN matrice :

- 100 ng d'ADN (simple-brin amplifié)

- 7 μ l de tampon Sequenase 5X (= Tris-HCl pH 7,5, 200 mM ; NaCl, 250 mM ; MgCl₂, 100 mM)

30 - H₂O qsp 22 μ l

* agiter à l'aide d'un vortex et centrifuger rapidement

* incuber au bain-marie à 95°C pendant 2 minutes.

* enlever vite et placer au bain-marie à 37°C pendant 10 minutes.

- * préparer le tampon de réaction pour un échantillon d'ADN, constitué de :
 - 2,5 µl DTT 0,1 M
 - 1 µl d'un mélange de ddNTP, dilué au 1/400 (ddTTP : 5 112 µM ; ddGTP : 1,12 µM ; ddATP : 3,36 µM ; ddCTP : 8,96 µM) ; et
 - H₂O qsp 6,5 µl
 - Séquénase 1 µl (3 unités)
 - * enlever les tubes du bain-marie et centrifuger rapidement,
 - * ajouter le tampon de réaction et mélanger,
 - * placer au bain-marie à 37°C, pendant 5 minutes,
 - * enlever les tubes et les placer dans la glace.
- b) Elimination des didésoxynucléotides froids en excès
- 15 On utilise les systèmes de microséparation Centricon 3 ou 10 (Amicon) qui, par filtration sur membrane accélérée par centrifugation, permettent de retenir des espèces moléculaires de poids moléculaire supérieur à 3 000 ou 10 000 Daltons (par exemple: un nucléotide correspond à 330 D et un oligonucléotide de synthèse de 20 mères correspond à 6 600 D).
 - disposer le volume réactionnel issu de a) dans un "Centricon" 3 ou 10 et diluer si nécessaire,
 - centrifuger à moins de 5 000 g en suivant les instructions du fabricant, de façon à récupérer un volume minimal,
 - inverser le système "Centricon",
 - centrifuger pour récupérer le volume réactionnel,
 - ramener le volume obtenu à 12 µl.
 - 25 30 c) Microséquençage (procédé conforme à l'invention)
 - * Pour chaque tube d'ADN, ajouter aux 12 µl :
 - 15 ng d'oligonucléotide 5' CATGGTGCACCTGACTCCTG 3' (OA), correspondant à la séquence s'arrêtant à la base adjacente à la position de la mutation
 - 35 - 7 µl de Tampon Séquénase 5X tel que défini en a) ci-dessus et procéder comme dans a) ; puis

10

- * préparer le tampon de réaction constitué pour chaque échantillon de :
 - 2,5 µl DTT 0,1 M
 - 1 µl d'une dilution au 1/400ème d'un mélange de ddNTP fluorescents (ddTTP* : 112µM ; ddGTP* : 1,12µM ; ddATP* : 3,36µM ; ddCTP* : 8,96µM). Les didésoxynucléotides fluorescents sont vendus par Du Pont (Genesis™ 2000 DNA Analysis System) ;
 - H₂O qsp 6,5 µl
 - 10 - Sequenase 1 µl (3 unités)
 - * enlever les tubes du bain-marie, centrifuger rapidement,
 - * ajouter le tampon de réaction, mélanger,
 - * placer au bain-marie à 37°C, pendant 5 mns,
 - 15 * enlever les tubes et placer les dans la glace.
- d) Lavage des didésoxynucléotides fluorescents en excès:
- * passer les échantillons sur colonne de Sephadex G50,
 - * récupérer les éluats.
- e) Détection
- 20 La détection se fait pour chaque échantillon après migration électrophorétique et excitation par une source telle qu'un laser. Le signal est analysé par un fluoromètre.
- On obtient les courbes a (témoin) et b (malade), comme visible sur la figure 1, qui permet de détecter au niveau de la position correspondant à une éventuelle mutation, l'incorporation d'un ddATP en a, pour l'individu sain et pour l'individu malade homozygote en b, l'incorporation d'un ddTTP.
- 25 30 Exemple 2 : Microséquençage d'une base sur une séquence d'acide nucléique (ADN du bacteriophage M13 mp8).
- a) Matériel de départ
- * ADN simple brin de bacteriophage M13mp8
 - * Oligonucléotide de synthèse dit Primer Universel de séquence : 3' TGACCGGCAGCAAAATG5'

11

La première base incorporée sur l'amorce dans le sens 5'-->3' est un G.

b) Protocole

Le protocole est équivalent au protocole de détection de mutation ponctuelle à partir de l'étape c de l'exemple 1. Les étapes a et b sont inutiles, l' ADN du phage M13 étant non contaminé par des oligonucléotides.

En variante, le protocole est le suivant :

- 3 µg d'A.D.N. simple-brin M13
- 10 - 15 ng d'oligonucléotide primer universel
- 7 µl de Tampon 5X Sequenase
- H₂O qsp 22 µl

La détection révèle l'incorporation sur le primer d'un dideoxy GTP, ce qui correspond au résultat attendu, comme visible sur la figure 2, qui montre les résultats obtenus avec deux dilutions différentes des ddNTP (1/200 (a) et 1/400ème (b)).

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mises en œuvres, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écartez du cadre, ni de la portée de la présente invention.

REVENDICATIONS

1*) Procédé de détection et/ou d'identification d'une base nucléotidique spécifique présente sur une séquence d'acide nucléique, caractérisé en 5 ce que :

(1) on hybridise la séquence sur laquelle se trouve la base à identifier avec un nucléotide de longueur suffisante pour permettre une hybridation correcte, quelle que soit la température de réaction, ledit nucléotide s'hybridant 10 avec la séquence cible, de manière à ce que son extrémité 3' soit adjacente à la base nucléotidique spécifique à détecter et/ou à identifier ;

(2) on débute la synthèse du brin complémentaire de l'hybride obtenu en (1), - ledit nucléotide servant 15 d'amorce -, en présence :

- d'une polymérase sans action exonucléase 3'5' et
- d'au moins une base nucléotidique modifiée, de manière à être incorporable dans le produit d'extension de l'amorce, ladite incorporation bloquant l'elongation 20 dudit produit d'extension ;

(3) on détecte la base nucléotidique bloquante incorporée par tout moyen approprié, ladite détection permettant d'identifier la base nucléotidique spécifique complémentaire présente sur la séquence cible à analyser.

25 2*) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les bases nucléotidiques bloquantes sont des didésoxynucléotides.

30 3*) Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que lesdites bases nucléotidiques bloquantes sont marquées de manière appropriée, notamment à l'aide d'un marqueur choisi dans le groupe qui comprend des substances radioactives, des enzymes, des produits chimiques chromophores fluorescents ou chimioluminescents et des anticorps appropriés.

4°) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le marqueur est identique ou différent pour chacune des bases nucléotidiques bloquantes.

5 5°) Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que lorsque les quatre bases bloquantes sont marquées à l'aide de marqueurs différents, la détection des quatre nucléotides bloquants est avantageusement simultanée.

10 6°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que lorsque les quatre bases bloquantes sont marquées de manière identique ou bien lorsqu'elles ne sont pas marquées, la détection des quatre nucléotides bloquants est réalisée successivement et/ou séparément.

15 7°) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'on dose, de manière appropriée, le pyrophosphate formé lors de la réaction de polymérisation, ledit dosage de pyrophosphate permettant de déterminer pour laquelle des bases une réaction de polymérisation s'est produite.

20 8°) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'on détecte chaque base nucléotidique bloquante marquée.

25 9°) Kit ou coffret de diagnostic, prêt à l'emploi, pour la mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend outre les quantités convenables de réactifs et tampons adaptés à la mise en oeuvre du procédé :

- des quantités appropriées d'un nucléotide, servant d'amorce, capable de s'hybrider avec la séquence cible de manière à ce que son extrémité 3' soit adjacente à la base nucléotidique spécifique à détecter ;
- des quantités appropriées de quatre bases nucléotidiques modifiées, de manière à être incorporables dans le produit d'extension de l'amorce tout en bloquant l'elongation dudit produit d'extension ; et

- des quantités appropriées d'une polymérase sans action exonucléase 3'5'.

10°) Kit ou coffret selon la revendication 9, caractérisé en ce que les bases nucléotidiques modifiées 5 sont des didésoxynucléotides.

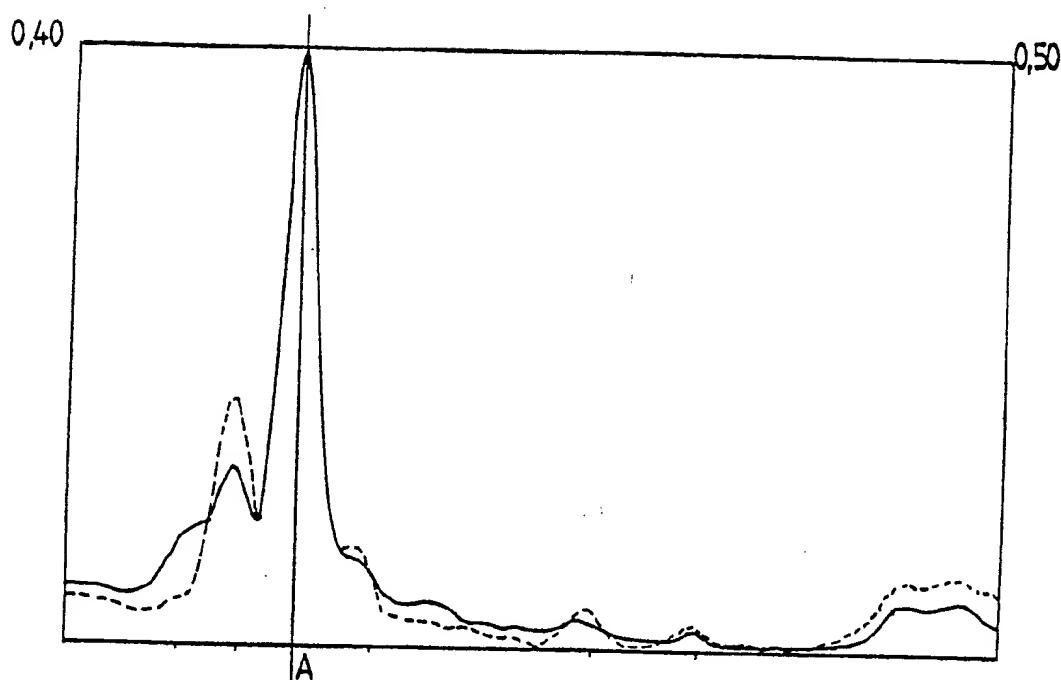
11°) Kit ou coffret selon la revendication 9 ou la revendication 10, caractérisé en ce que les bases nucléotidiques modifiées sont marquées de manière appropriée, notamment à l'aide d'un marqueur choisi dans le 10 groupe qui comprend des substances radioactives, des enzymes, des produits chimiques chromophores fluorescents ou chimioluminescents et des anticorps appropriés.

12°) Kit ou coffret selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend, 15 en outre, des réactifs appropriés pour le dosage du pyrophosphate.

13°) Application du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, à la détection de la présence de séquences d'acides nucléiques particulières 20 associées à des maladies, telles que maladies génétiques ou maladies cancéreuses, à des infections, ou propres à permettre, l'identification d'individus humains, animaux ou végétaux.

1 / 2

a)



b)

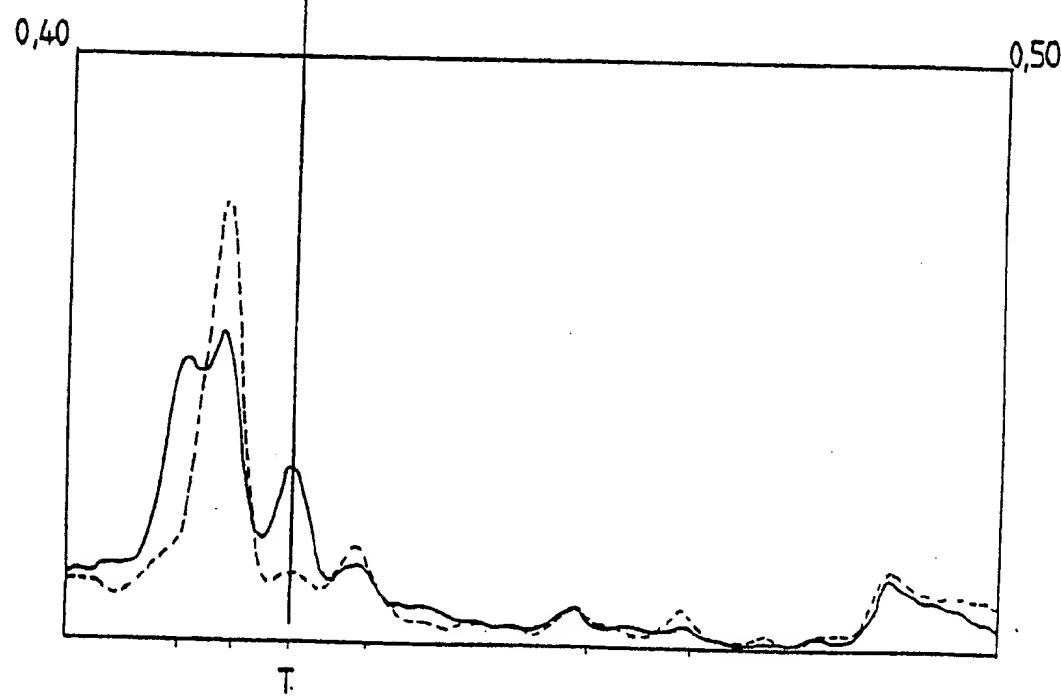


FIG. 1

FEUILLE DE REMplacement

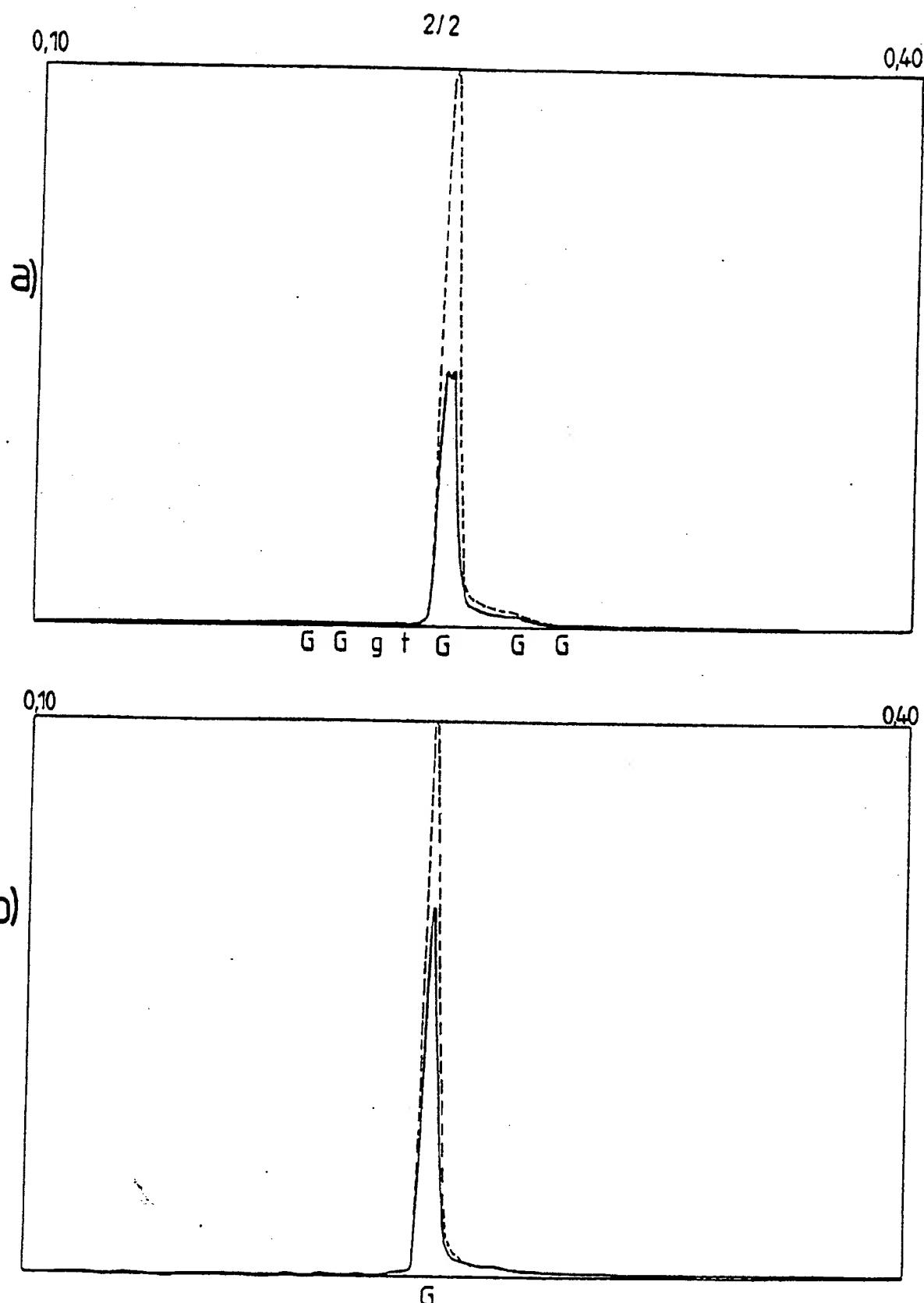


FIG. 2

FEUILLE DE REMPLACEMENT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR90/00585

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl.5 C12Q 1/68

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched 7

Classification System	Classification Symbols
Int.Cl.5	C12Q

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*

Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
Y	EP, A, 0223618 (NEW YORK MEDICAL COLLEGE) 27 May 1987 see the whole document ---	1-13
Y	EP, A, 0123513 (AMERSHAM INTERNATIONAL PLC) 31 October 1984 see the whole document & US, A, 4656125 (cited in the application) ---	1-13
A	EP, A, 0141382 (FUJI PHOTO FILM CO.) 15 May 1985 see abstract; pages 10,11 ---	1-11
A	WO, A, 88/05470 (PRESIDENT & FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 28 July 1988 see the whole document ---	1-11
P,A	EP, A, 0332435 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 13 September 1989 see abstract; pages 2-9 -----	1-11

* Special categories of cited documents: ¹⁰

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

27 November 1990 (27.11.90)

Date of Mailing of this International Search Report

18 December 1990 (18.12.90)

International Searching Authority

European Patent Office

Signature of Authorized Officer

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9000585
SA 39509

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 11/12/90. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A- 0223618	27-05-87	US-A-	4863849	05-09-89
		JP-A-	62085863	20-04-87
EP-A- 0123513	31-10-84	CA-A-	1219793	31-03-87
		DE-A-	3469366	24-03-88
		JP-A-	59208465	26-11-84
		US-A-	4656127	07-04-87
EP-A- 0141382	15-05-85	JP-A, B, C	60093354	25-05-85
		CA-A-	1257184	11-07-89
WO-A- 8805470	28-07-88	US-A-	4795699	03-01-89
		AU-A-	1022488	21-07-88
		EP-A-	0265293	27-04-88
		EP-A-	0386857	12-09-90
		EP-A-	0386858	12-09-90
		EP-A-	0386859	12-09-90
		JP-A-	63237798	04-10-88
		US-A-	4942130	17-07-90
		US-A-	4921794	01-05-90
		US-A-	4946786	07-08-90
EP-A- 0332435	13-09-89	AU-A-	3124689	14-09-89
		JP-A-	2042999	13-02-90

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 90/00585

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB⁵: C 12 Q 1/68

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ

Documentation minimale consultée ⁸

Système de classification	Symboles de classification
CIB ⁵	C 12 Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰

Catégorie [*]	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
Y	EP, A, 0223618 (NEW YORK MEDICAL COLLEGE) 27 mai 1987 voir le document en entier --	1-13
Y	EP, A, 0123513 (AMERSHAM INTERNATIONAL PLC) 31 octobre 1984 voir le document en entier & US, A, 4656125 (cité dans la demande) --	1-13
A	EP, A, 0141382 (FUJI PHOTO FILM CO.) 15 mai 1985 voir l'abrégé; pages 10,11 --	1-11
A	WO, A, 88/05470 (PRESIDENT & FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 28 juillet 1988 voir le document en entier --	1-11
		.. / ..

* Catégories spéciales de documents cités: ¹¹

- «A» document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- «E» document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- «L» document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation, ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- «O» document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- «P» document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

«T» document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

«X» document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive

«Y» document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.

«A» document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 novembre 1990

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18 DEC 1990

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

Mme N. KUIPER

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS**(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR LA
DEUXIÈME FEUILLE)**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
P,A	EP, A, 0332435 (IMPERIAL CHEMICAL INDUS- TRIES PLC) 13 septembre 1989 voir l'abrégé; pages 2-9	1-11

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9000585
SA 39509

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 11/12/90
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
EP-A- 0223618	27-05-87	US-A-	4863849	05-09-89
		JP-A-	62085863	20-04-87
EP-A- 0123513	31-10-84	CA-A-	1219793	31-03-87
		DE-A-	3469366	24-03-88
		JP-A-	59208465	26-11-84
		US-A-	4656127	07-04-87
EP-A- 0141382	15-05-85	JP-A, B, C	60093354	25-05-85
		CA-A-	1257184	11-07-89
WO-A- 8805470	28-07-88	US-A-	4795699	03-01-89
		AU-A-	1022488	21-07-88
		EP-A-	0265293	27-04-88
		EP-A-	0386857	12-09-90
		EP-A-	0386858	12-09-90
		EP-A-	0386859	12-09-90
		JP-A-	63237798	04-10-88
		US-A-	4942130	17-07-90
		US-A-	4921794	01-05-90
		US-A-	4946786	07-08-90
EP-A- 0332435	13-09-89	AU-A-	3124689	14-09-89
		JP-A-	2042999	13-02-90